定点突变提高醇脱氢酶 LkTADH 催化制备他汀关键手性砌块的酶活[1]

陈方，徐刚，杨立荣，吴坚平*

浙江大学化学工程与生物工程学院生物工程研究所 浙江 杭州 310027

摘要 *(S)*-6-氯-3-羰基-5-羟基己酸叔丁酯（*(S)*-CHOH）是他汀类药物合成的关键手性中间体。利用醇脱氢酶催化 6-氯-3,5-二羰基己酸叔丁酯不对称合成*(S)*-CHOH 是很有潜力的制备路线，目前存在的主要问题是醇脱氢酶催化活性较低。首先对来源于 *Lactobacillus kefir* DSM 20587 的醇脱氢酶的四点突变体 LkTADH（A94T/F147L/A202L/L199H）进行回复突变，确定了关键位点 147 和 202 位，并获得比酶活提高 1 倍的突变体 $M_{F147L\text{-}A202L}$。对这两个位点进行饱和突变，获得比酶活比 LkTADH 提高 1.47 倍的突变体 $M_{F147I\text{-}A202L}$。其比酶活为 10.17U/mg，为目前文献报道最高水平。通过动力学分析和分子对接，分析了突变位点对酶活影响的机理，为后续研究奠定了良好的基础。

关键词 醇脱氢酶 (S)-6-氯-3-羰基-5-羟基己酸叔丁酯 不对称合成 分子改造 饱和突变

Enhancing the Activity of LkTADH by Site-Directed Mutagenesis to Prepare Key Chiral Block of Statins

CHEN Fang, XU Gang, YANG Li-rong, WU Jian-ping *

College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

Abstract: *(S)*-*tert*-butyl-6-chloro-5-hydroxyl-3-oxohexanoate (*(S)*-CHOH) is the key chiral intermediate of statins. Asymmetric reduction of *tert*-butyl-6-chloro-3,5- dioxohexanoate (CDOH) to *(S)*-CHOH catalyzed by alcohol dehydrogenases is a promising method. Nevertheless, the main problems is the low catalytic activity towards CDOH. First an alcohol dehydrogenase LkTADH (A94T/F147L/L199H/A202L) was further studied by reverse mutation and key sites (147,202) had been identified. $M_{F147L\text{-}A202L}$ was obtained, which demonstrated 1-fold improvement in specific activity over LkTADH. After applying saturation mutagenesis at these two sites, $M_{F147I\text{-}A202L}$ was obtained with 1.47-fold improvement in specific activity over LkTADH. The specific activity reached 10.17U/mg, which is the highest level as reported. Through dynamic analysis and molecular docking, the effect of mutation sites on enzyme activity was further analyzed.

Key Words: alcohol dehydrogenase, *(S)*-*tert*-butyl-6-chloro-5-hydroxyl-3-oxohexanoate, asymmetric synthesis, molecular modification, saturated mutation.

[1]国家自然科学基金面上项目（21676240）、国家“973”计划（2011CB710800）资助项目
通讯作者，电子邮箱：wjp@zju.edu.cn

引言

他汀类药物是近年来开发最为成功的降血脂药物， 在 2016 年处方药销售前十名排行榜中占了 2 种。*(S)*-6-氯-3-羰基-5-羟基己酸叔丁酯（*(S)*-CHOH）是他汀类药物的关键手性砌块，可用于合成阿托伐他汀钙（立普妥）和瑞舒伐他汀钙（可定）等。

目前合成*(S)*-CHOH 的方法有很多，其中氯酯路线已经实现了工业化[1,2]，而利用醇脱氢酶催化6-氯-3,5-二羰基己酸叔丁酯(CDOH)不对称合成*(S)*-CHOH是很有潜力的制备路线[3]。目前存在的主要问题是醇脱氢酶催化活性较低，且仅有三种醇脱氢酶能催化这一反应：一种是来源于 *Lactobacillus brevis* DSM 20054 的醇脱氢酶 LbADH[4,5]，一种是来源于 *Lactobacillus kefir* DSM 20587 的醇脱氢酶 LkADH[6]，另一种是 LkADH 的四点突变体 LkTADH[3]（A94T/F147L/A202L/L199H)。其中 LkTADH 催化活力最高，如能进一步提高 LkTADH 的酶活，则将更具有工业化应用前景。

Cl O O O O CDOH → Cl OH O O O (S)-CHOH

图 1 生物不对称合成*(S)*-CHOH 反应路线

Fig.1 The biosynthesis route of *(S)*-CHOH

本研究从 LkTADH 出发，首先通过对其进行回复突变确定关键位点，接着对关键位点进行饱和突变，并对酶活提高的位点进行组合，获得酶活最高的突变体 $M_{F147I\text{-}A202L}$，其比活为 10.17U/mg，是 LkTADH(4.11U/mg)的 2.47 倍。通过动力学分析和分子对接进一步探究突变位点对酶活的影响。

1 材料与方法

1.1 工具酶和生化试剂

PrimeSTAR® MAX DNA Polymerase 和 *Dpn* I 限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司。质粒 DNA 小量制备试剂盒，DNA 凝胶回收试剂盒均购自杭州 Axygen Biotechnology 公司。卡那霉素(kan)和异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)购自北京鼎国生物技术有限责任公司。CDOH 和(S)-CHOH 由本实验室合成(后 CDOH 购自杭州杨德医药科技有限公司)。其他试剂均为国产分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 突变体的构建

设计含有突变氨基酸的 PCR 引物，以 pET30-LkTADH 质粒为模板进行全质粒 PCR，PCR 产物经凝胶电泳分析后用 *Dpn* I 酶消化质粒模板，消化产物直接转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态，涂布于含有卡那霉素的抗性平板上，过夜培养后挑取单菌落进行测序。

1.3 菌株的表达和纯化

将构建好的突变体在含有 kan 的 LB 固体平板上划出单菌落，挑取单菌落接种于装有 5ml 含有 50 μ g/mL kan 的 LB 培养基中，37℃，200r/min 培养 8 小时，以 2%（v/v）的接种量转入 50ml 含有 50 μ g/mL kan 的 LB 培养基中，37℃，200r/min 培养 2-3 小时至吸光度 OD600 为 0.6-0.8，加入 IPTG（终浓度为 0.5mM）诱导并在 18℃继续培养 14 小时。4000rpm，15min 收集菌体沉淀，用 pH7.0 的磷酸盐裂解缓冲液重悬细胞，超声破碎后 4℃、12000r/min 离心 10min，取上清用 Ni-NTA 重力柱进行纯化。

1.4 酶活测定

产物*(S)*-CHOH 的浓度检测采用 HPLC 方法。4000r/min 下离心 15min，收获菌体，全细胞进行反应，反应体系为 1ml pH 为 5.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠-NaOH 缓冲液，10mM 的 CDOH（预溶于 50%v 异丙醇），终浓度为 1mM 的 NADPH，加入适量的细胞悬浮液后于金属浴中 30℃，600rpm 振荡反应 20min，反应液离心（8000r/min、5min），收集上清过滤后待 HPLC 检测（每个反应做 3 个重复）。（控制转化率在 10%以内）

酶活单位（U）定义为：在所述条件下，每分钟产生 1 μmol *(S)*-CHOH 所需的酶量。酶活计算公式如下：

$$酶活(U/mL) = \frac{X_{(S)} \times 10^3}{t_{reaction} \times A}$$

式中，$X_{(S)}$表示产物浓度（μM），$t_{reaction}$表示反应时间(min)， A 表示所加的酶量（μL）。

1.5 突变酶的动力学参数测定

反应体系为 1ml，在 pH5.5 柠檬酸-Na_2HPO_4-NaOH 缓冲液中加入不同浓度的 CDOH（1~10mM），固定 NADPH 的浓度为 1.0mM，加入等量酶在 30℃下反应，分别测定不同底物浓度下的反应初速度。因过程中发现底物 CDOH 对酶有抑制作用，数据拟合采用 Licata 等[7]提出的底物抑制存在下的动力学模型：

$$V = \frac{V_{max} + V_i([S]^x/K_{is}{}^x)}{1 + (K_m{}^n/[S]^x) + ([S]^x/K_{is}{}^x)}$$

采用 origin 软件进行数据的曲线拟合计算出相应的动力学参数。

1.6 同源建模和分子对接

搜索蛋白质 PDB 数据库，获得醇脱氢酶 LkADH[8]的蛋白晶体结构，此结构与 LkTADH 只有四个氨基酸差异，并通过在线服务器上的 PROCHECK 和 ERRAT2 模块（http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/）对模型进行评估。利用 Discovery Studio 4.0 的 LibDock 将处理过的底物小分子与蛋白模型进行对接，以是否与 Ser^{143} 和 Tyr^{156} 形成氢键[9,10]来筛选产生的 pose。并将形成氢键的 pose

根据 LibDock 打分排序，选取分数最高者做后续优化。

2. 结果讨论

2.1 回复突变确定关键位点

2.1.1 突变体的构建和表达

为深入探究 LkTADH 四个突变位点对酶活的影响，以 pET30-LkTADH 为模板进行回复突变，构建一系列回复突变体（表 1）。突变体全质粒 PCR 产物经琼脂糖核酸电泳分析结果如图 2 所示，得到约 6200bp 的目的条带，大小与理论值相符，同时序列测定结果也正确。

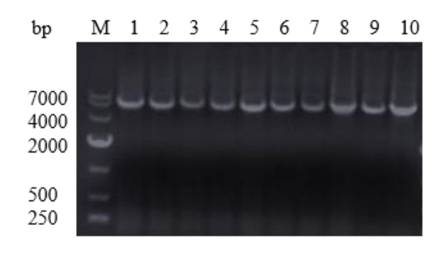


图 2 回复突变体的基因电泳图

Fig.2 Gene electrophoretogram of genomic DNA from mutants

Lane M: DNA marker, Lane 1-10: mutants genome from Table1.

将构建好的突变体进行表达，突变酶的表达情况基本一致，如图 3（a）所示，典型突变体 LkTADH、 M_{F147L}、M_{A202L}、$M_{F147L\text{-}A202L}$ 表达情况均良好，所表达的重组蛋白大小一致，均在 33kDa 左右。

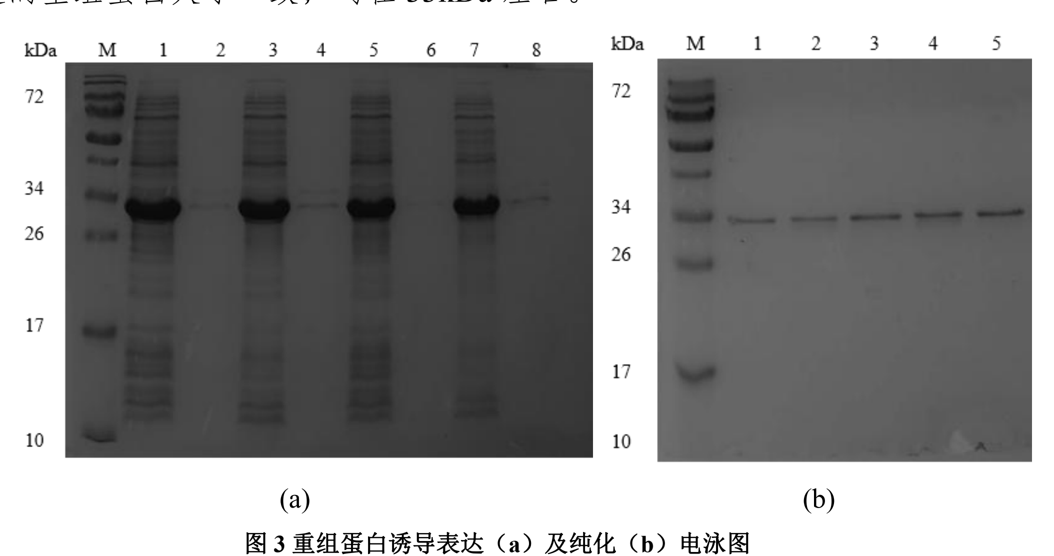


图 3 重组蛋白诱导表达（a）及纯化（b）电泳图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of mutants overpressed in the recombinant *E.coli* (a) and purified forms(b)

(a):Lane M: Protein marker, Lane 1、3、5、7:Supernatant extract of LkTADH、M_{F147L}、M_{A202L} and $M_{F147L\text{-}A202L}$,Lane 2、4、6、8:Sediment extract of LkTADH、M_{F147L}、M_{A202L} and $M_{F147L\text{-}A202L}$.

(b):Lane M: Protein marker, Lane 1-5: purified LkTADH、M_{F147L}、M_{A202L} 、$M_{F147L\text{-}A202L}$ and $M_{F147I\text{-}A202L}$.

2.1.2 关键位点的确定

如表 2 所示，两点突变体 $M_{F147L-A202L}$ 酶活最高，较 LkADH 提高 118 倍，其中 F147L 贡献最大，其单点突变就使酶活提高了 90 倍。A202L 单点突变虽然仅能提高 3 倍酶活，但和 F147L 突变有叠加效应，能将 M_{F147L} 酶活进一步提高 30%（5,7,8 行数据）。L199H 突变虽然会使 M_{A202L} 的酶活有些许的提高，但在 $M_{F147L-A202L}$ 和 M_{F147L} 的基础上叠加 L199H 突变酶活均有很大程度的下降，尤其突变体 $M_{F147L-A202L-L199H}$ 酶活相较于 $M_{F147L-A202L}$ 下降了 5/6（4-8，10 行数据）。在 M_{F147L} 和 $M_{F147L-A202L}$ 的基础上引入 A94T 突变酶活也呈现下降趋势（7-9，11 行数据）。表明 L199H 和 A94T 突变会引起酶活的降低。

基于上述分析比较，选取突变体 LkTADH、M_{F147L} 、M_{A202L} 、$M_{F147L-A202L}$ 进行蛋白纯化测定比酶活。从图 3（b）中可以看出，纯酶的电泳结果显示为单一条带，分子量约为 33kDa。经测定 M_{F147L} 的比活为原始酶 LkADH 的 69 倍，出发酶 LkTADH 的 1.51 倍，$M_{F147L-A202L}$ 的比活为 LkTADH 的 2.06 倍。由此进一步说明突变点 F147L 和 A202L 在提高 LkADH 的催化活性上具有促进作用，确定 147 和 202 位点为后续的突变热点。

表 1　LkTADH 回复突变体对 CDOH 的活力比较

Table1　Enzyme activities of back mutants of LkTADH towards CDOH

	ADHs	Enzyme Activity(U/L)	Relative activity（%）	Specific activity(U/mg)
1	LkADH	7	100	0.09
2	LkTADH	203	2900	4.11
3	$M_{A202L-L199H-A94T}$	70	1000	--
4	$M_{A202L-L199H}$	35	500	--
5	M_{A202L}	28	400	0.75
6	$M_{F147L-A202L-L199H}$	140	2000	--
7	$M_{F147L-A202L}$	832	11900	8.47
8	M_{F147L}	636	9100	6.21
9	$M_{F147L-A94T}$	490	7000	--
10	$M_{F147L-L199H}$	126	1800	--
11	$M_{F147L-A202L-A94T}$	277	4000	--

2.2 关键位点的饱和突变

为进一步提高酶活，以 $M_{F147L-A202L}$ 为对象，对 147，202 位点进行饱和突变。由图 4 可知，突变体 $M_{F147M-A202L}$、$M_{F147C-A202L}$、$M_{F147I-A202L}$、和 $M_{F147L-A202V}$、$M_{F147L-A202I}$ 的酶活均比 $M_{F147L-A202L}$ 高，其中 $M_{F147I-A202L}$ 的全细胞酶活最高（1248U/mL），比 $M_{F147L-A202L}$ 提高 50%。突变后的氨基酸均为疏水性较强的氨基酸，推测两个位点疏水性强弱对酶活有很大影响。经蛋白纯化(图 3-b)测定 $M_{F147I-A202L}$ 比酶活为 10.17U/mg，是 LkTADH 的 2.47 倍。随后尝试对酶活提高的突变点进行组合，希望能进一步提高酶活，可惜的是经测定，$M_{L147I-L202I}$、$M_{L147C-L202I}$、$M_{L147M-L202I}$、$M_{L147I-L202V}$、$M_{L147M-L202V}$ 和 $M_{L147C-L202V}$ 的酶活均低于

$M_{L147I\text{-}A202L}$。

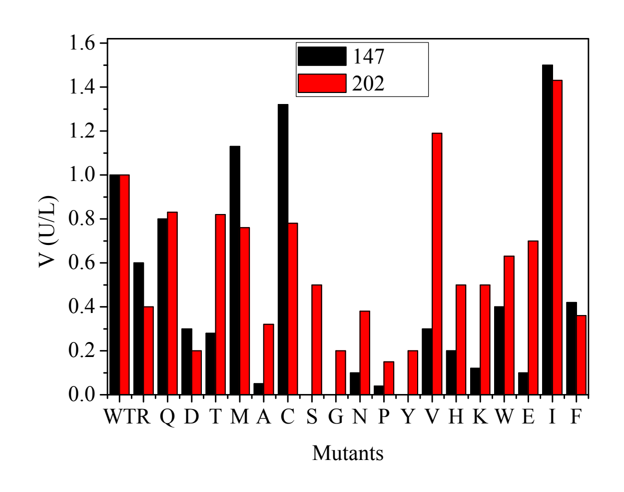


图 4 L147 和 L202 位点不同突变体对 CDOH 的活力比较

Fig.4 Enzyme activities of saturation mutants of LkTADH(L147 and L202) towards CDOH

2.3 突变体动力学分析

为深入研究突变点的作用机制，以 CDOH 为底物分别测定了 $M_{F147L\text{-}A202L\text{-}A94T\text{-}L199H}$ 、$M_{F147L\text{-}A202L}$ 和 $M_{F147I\text{-}A202L}$ 的反应动力学常数（表 2）。和四点突变体 $M_{F147L\text{-}A202L\text{-}A94T\text{-}L199H}$ 相比，不引入突变点 A94T 和 L199H 时主要提高了酶对底物的亲和力（K_m 值变为原来的 60%），K_{cat} 仅略有下降，综合效果使得酶的底物特异性常数（K_{cat}/K_m）从 11.27mM/s 提高到 15.36mM/s。此外，$M_{F147L\text{-}A202L}$ 的底物抑制情况也有所缓解，不仅抑制常数 K_{is} 提高了近一倍，高浓度下的 $K_{cat(i)}$ 也提高了近一倍。而当 $M_{F147L\text{-}A202L}$ 突变为 $M_{F147I\text{-}A202L}$ 时，催化效率和抑制常数仅有少量提高。

表 2　突变酶动力学参数比较

Table2　The kinetics paramaters of mutants

ADHs	K_m(mM)	$K_{cat}(s^{-1})$	K_{cat}/K_m(mM/s)	K_{is}(mM)	$K_{cat(i)}$ (s^{-1})
$M_{F147L\text{-}A202L\text{-}A94T\text{-}L199H}{}^{0.99}$	4.18	47.10	11.27	1.87	1.05
$M_{F147L\text{-}A202L}{}^{0.98}$	2.61	40.11	15.36	3.22	1.88
$M_{F147I\text{-}A202L}{}^{0.94}$	2.63	45.52	17.23	3.65	1.89

上标为拟合曲线的 R^2

2.4 关于突变位点的作用机理解析

利用 Discovery Studio 以底物 CDOH 为配体，以 LkTADH 和 $M_{F147I\text{-}A202L}$ 为受体进行分子对接，对接结果如图 5，在酶的活性中心 Ser143 和 Tyr156 均与底物 CDOH 中 C5 羰基氧形成氢键。关于 F147L 和 A202L 突变的影响在本实验室前期发表的论文中已有解释[3]，F147L 主要提高酶的稳定性，而 A202L 则提高底物口袋的疏水性。故主要探讨 94 和 199 位的影响。从图(6-a，6-b)中可以看出 94、199 位点处于底物口袋上方，A94T 和 L199H 均由小的氨基酸突变为结构更大的氨基酸，使得 LkTADH 口袋入口处空间比 $M_{F147I\text{-}A202L}$ 小，底物口袋的

拥堵会造成底物进入口袋困难。从图 7-a 和 7-b 中发现突变前后 94 位的 Ala 与 156 位 Tyr 之间的氢键键长没有太大变化，但催化三联体 143S-156Y-160K 中的 156 位的 Tyr 与 CDOH 叔丁基末端的 C 形成了氢键，使得底物更靠近催化三联体，提高了酶与底物的亲和力。从图中也可以看出突变前后 CDOH 5 位上的羰基与催化三联体 143S 和 156Y 的羟基之间形成的氢键键长分别由 3.03Å、2.98Å 变为 2.73Å和 2.41Å，酶与底物的亲和力增强。同时 A94T 和 L199H 均由疏水氨基酸突变为亲水性的氨基酸使得底物入口处疏水性减弱，不利于酯类底物 CDOH 进入活性中心。且 199 位和 94 位位于特殊的结合 loop 区上，两者之间范德华力的大小对 loop 区打开-关闭状态起操纵作用，当作用力较大不易形成打开状态时因为底物难于进入产物不易释放酶活就会降低[8]。

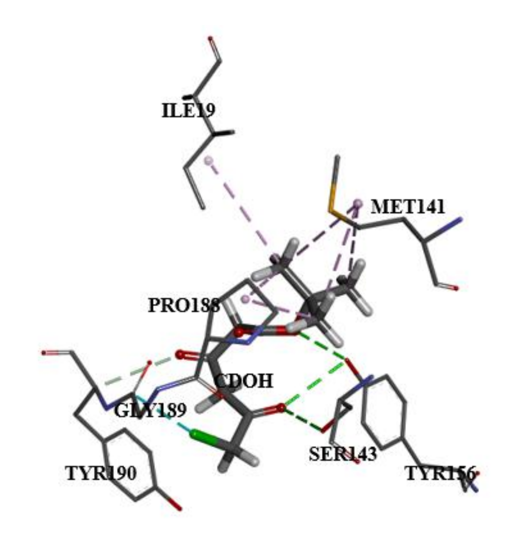
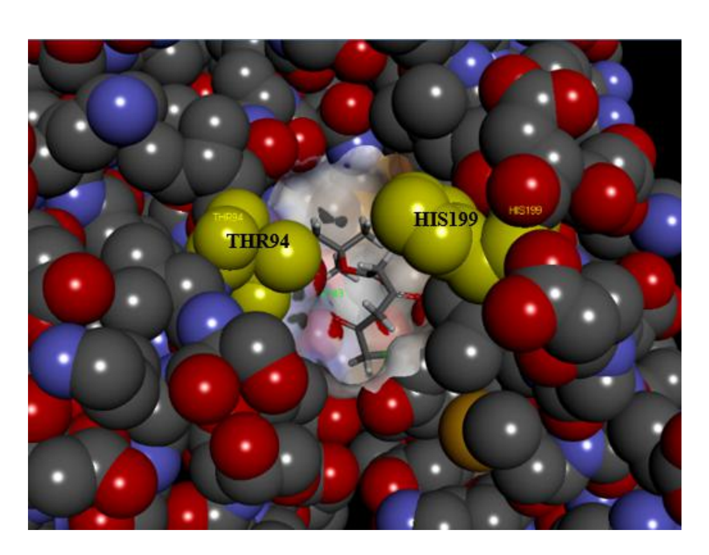
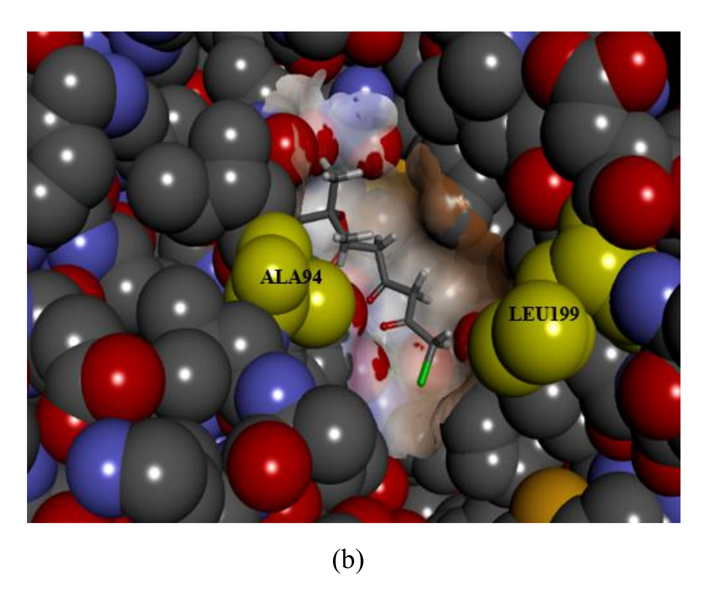


图 5　醇脱氢酶 LkTADH 的催化活性中心与底物的作用

Fig.5 Representation of the interactions between CDOH and LkTADH by molecular docking.



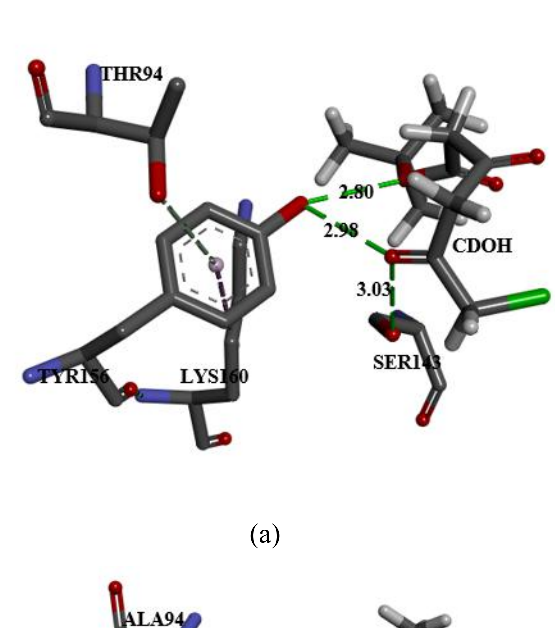
(a)



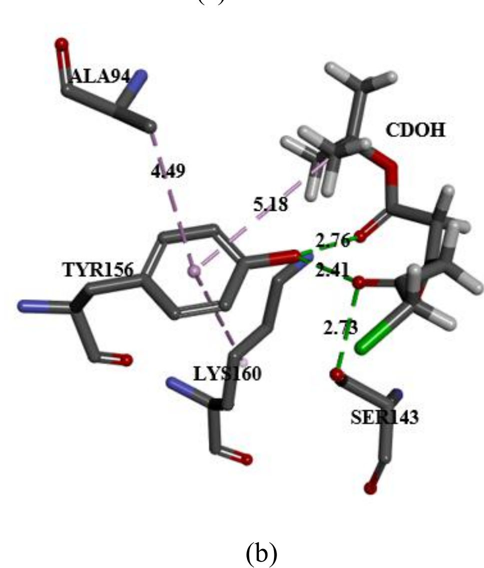
(b)

图 6 94 和 199 位点在蛋白结构 LkTADH(a)和 $M_{F147I-A202L}$(b) 中的位置

Fig. 6 Locations of mutation sites of LkTADH (a) and $M_{F147I-A202L}$ (b)



(a)



(b)

图 7 94 位在蛋白结构 LkTADH(a)和 $M_{F147I-A202L}$(b) 中的位置及相互作用情况

Fig.7 Locations of mutation sites 94 of LkTADH (a) and MF147I-A202L (b) and interactions between

enzymes and substrate CDOH

3 结论

本研究从实验室菌株 LkTADH（$M_{F147L\text{-}A202L\text{-}A94T\text{-}L199H}$）出发，通过回复突变确定关键位点 147 和 202 并进行饱和突变。得到突变体 $M_{F147I\text{-}A202L}$，比酶活为 10.17U/mg，较 LkTADH 提高了 1.47 倍。通过动力学分析和分子对接发现，A94T 和 L199H 突变会造成底物通道拥堵的情况，阻碍底物进入活性口袋，改造前后底物和酶的亲和力得到提高。由于缺乏有效的高通量方法，导致筛选范围较小，筛选效率较低，后续研究可尝试建立一种有效的高通量筛选方法扩大筛选范围，以得到酶活更高的菌株。

参考文献

[1] He Y, Zhang D, Tao Z, et al. Improved biosynthesis of ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by adding L-glutamine plus glycine instead of NAD^+ in *β*-cyclodextrin–water system[J]. *Bioresource Technology*. 2015, 182: 98-102.

[2] Liu Z, Ye J, Shen Z, et al. Upscale production of ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by using carbonyl reductase coupled with glucose dehydrogenase in aqueous-organic solvent system [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, 99(5): 2119-2129.

[3] Xiujuan He, Shaoyun Chen, Jianping Wu*, Gang Xu, Lirong Yang*. Highly efficient enzymatic synthesis of tert-butyl (S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoate with a mutant alcohol dehydrogenase of Lactobacillus kefir. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015,99:8963-8975.

[4] Wolberg M, Hummel W, Muller M. Biocatalytic reduction of beta, delta-diketo esters: a highly stereoselective approach to all four stereoisomers of a chlorinated beta,delta-dihydroxy hexanoate[J]. *Chemistry-a European Journal*. 2001, 7(21): 4562-4571.

[5] Wolberg M, Hummel W, Wandrey C, et al. Highly regio- and enantioselective reduction of 3,5-dioxocarboxylates[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2000, 39(23): 4306.

[6] Weckbecker A, Hummel W. Cloning, expression, and characterization of an (*R*)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* [J]. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2006, 24(5): 380-389.

[7] Licata V J, Allewell N M. Is substrate inhibition a consequence of allostery in aspartate transcarbamylase?[J]. *Biophys Chem*. 1997, 64(1-3): 225-234.

[8] Elizabeth.Noey, Nidhi Tibrewal. Origins of stereoselectivity in evolved ketoreductase.[J]. *PNAS*. 2015, 12(7): E7065-E7072.

[9] Schlieben N H, Niefind K, Muller J, et al. Atomic resolution structures of *R*-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity[J]. *Journal of Molecular Biology*. 2005, 349(4): 801-813.

[10] Filling C, Berndt K D, Benach J, et al. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases[J]. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2002, 277(28): 25677-25684.